

Dermatologie 2023 · 74:171–181
<https://doi.org/10.1007/s00105-023-05112-x>
Angenommen: 10. Januar 2023
Online publiziert: 2. Februar 2023
© Der/die Autor(en) 2023



Einfluss von Konservierungsmitteln in Topika auf die kutane Mikrobiota

Kathrin Richter¹ · Johannes Wohlrab^{1,2}

¹ Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland

² An-Institut für angewandte Dermatopharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland

Zusammenfassung

Konservierungsmittel dienen der Haltbarmachung topischer Präparate und schützen dadurch den Anwender vor dem Einfluss pathogener Mikroben. Mit der Applikation des Topikums durchläuft die Matrix eine Metamorphose, in deren Folge es, durch anteilige Volatilisierung der hydrophilen Phase, zur Anreicherung des Konservierungsmittels auf der Hautoberfläche kommen kann. Es wird angenommen, dass dies zu antiseptischen Effekten und der Beeinflussung der Diversität der kutanen Mikrobiota führt.

Wegen der Komplexität der Regulation des kutanen Mikrobioms und der damit verbundenen Einflussfaktoren resultiert ein hoher Grad der Individualisierung, sodass Untersuchungen zum Einfluss von definierten Interventionen methodisch schwierig sind. In der vorliegenden „Proof-of-concept“-Studie wurden mögliche antiseptische Effekte von Konservierungsmitteln in einer Kombination von In-vitro- und In-vivo-Methoden mittels mikrobiologischer Kulturversuche untersucht. Darüber hinaus dienten die Untersuchungen der Erarbeitung eines klinischen Studiendesigns für weiterführende Fragestellungen und erweitertem Methodenspektrum.

Die Ergebnisse stützen die Hypothese einer antiseptischen Wirkung der getesteten Konservierungsmittel (Methyl-4-hydroxybenzoat und Propyl-4-hydroxybenzoat, Sorbinsäure/Kaliumsorbat und Propylenglykol) auf prominente Referenzbakterien und konnten auch im klinischen Setting beobachtet werden.

Schlüsselwörter

Kutanes Mikrobiom · Mikrobiota · Konservierungsmittel · Vehikelsystem · Vehikelmetamorphose

Einführung

In den letzten Jahren ist die Bedeutung der kutanen Mikrobiota (Gesamtheit aller auf der Haut lebenden Mikroorganismen) für die Homöostase des Hautorgans immer deutlicher geworden [1, 2]. Sie wird heute als ein diverses Ökosystem verstanden, welches hauptsächlich aus grampositiven Bakterien besteht und die menschliche Haut je nach Region und Individuum in unterschiedlicher Dichte und Zusammensetzung besiedelt [1, 3]. So wird die kutane Mikrobiota als funktionaler und aktiver Teil der epidermalen Barriere aufgefasst, da sie sowohl dem Wachstum potenziell

pathogener Bakterien entgegenwirkt als auch mit fremden Mikroorganismen kommuniziert und darüber hinaus mit dem Immunsystem des Wirts interagiert [4, 5]. Dieses Ökosystem wird von genetischen Komponenten geprägt, maternal erworben und im Laufe des Lebens adaptiert [6, 7]. Die funktionelle Verzahnung dieser Symbiose wird besonders dann deutlich, wenn es durch pathogenetische Veränderungen zu einer relevanten Dysbiose und daraus folgend zu einer phänotypischen Erkrankung kommt.

Das Bewusstsein für diese Zusammenhänge ist sowohl auf die Fortschritte in der molekularen Analytik zur Identifizierung



QR-Code scannen & Beitrag online lesen

des kutanen Mikrobioms als auch auf ein erweitertes immunologisches Verständnis zur funktionellen Bedeutung der Interaktionsmuster von Mikrobiota und Wirt zurückzuführen [8, 9]. Insbesondere durch spezielle molekularbiologische Technologien wie die Metagenomsequenzierung oder das Next Generation Sequencing (NGS) werden eine genaue taxonomische Zuordnung identifizierter Arten sowie eine Charakterisierung der Diversität des Mikrobioms ermöglicht [10]. Im Rahmen der NGS wird eine Analyse der bakteriellen DNA durchgeführt, die Bezug auf hochkonservierte und hochvariable Regionen des *16S-rRNA*-Gens als Teil des bakteriellen Ribosoms nimmt [11]. Das zur Sequenzierung verwendete PCR-Produkt wird durch spezifische Primer erzeugt, die an die hochkonservierten Regionen in unmittelbarer Nachbarschaft der variablen Regionen des *16S-rRNA*-Gens der Bakterien binden. Anschließend wird das generierte Amplifikat sequenziert, und die dabei ermittelten Sequenzvarianten werden durch bioinformatische Analysen mit *16S-rRNA*-Gen-Sequenzen bekannter Bakterien aus Datenbanken verglichen und taxonomisch klassifiziert [12]. Probleme dieser Analysen liegen in der Auswahl der variablen Regionen sowie im Umstand, dass die Methodik und das Material der Probenahme sehr fehleranfällig sind, begründet [13, 14]. Deshalb wird der parallele Einsatz eines zweiten Nachweisverfahrens, wie z. B. der Matrix-Assisted Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectroscopy (MALDI-TOF MS), propagiert [15–17]. Diese Herangehensweise steigert allerdings den zeitlichen und finanziellen Aufwand von Studien erheblich, ist aber dem parallelen Einsatz konventioneller mikrobiologischer Kulturtechniken sehr wahrscheinlich überlegen [18]. Das Mikrobiom ist ein extrem komplexes und intra- sowie interindividuell variables System, welches zudem von vielen intrinsischen und extrinsischen Faktoren beeinflusst werden kann [19, 20]. Mittels *16S rRNA*-Sequenzierung lässt sich das genetische Material der Bakterien analysieren, jedoch können mit dieser Methode keine Aussagen über den Vitalitätszustand der Mikroben getroffen werden, was Untersuchungen zu antiseptischen Effekten

von Konservierungsmitteln methodisch schwierig macht [21, 22].

Es ist zudem unklar, wie lange nach einer Anwendung mikrobizider Präparate auf der Hautoberfläche genetisches Material der avitalen Mikroben persistiert und damit molekularbiologisch erfasst werden kann [23, 24]. Folglich ist die Analyse von antiseptischen Effekten nach Interventionen mittels *16S-rRNA*-Sequenzierung nur eingeschränkt möglich. Im Gegensatz dazu bieten klassische Kulturverfahren zwar die Möglichkeit, einzelne Bakterienarten zu analysieren, lassen aber keine Aussagen zur Diversität der Mikrobiota zu und sind von verwendeten Kulturmedien, Kulturbedingungen und der Wachstumsdynamik der jeweiligen Art (Zeit-Überleben-Kurve) abhängig. Das Wachstumsverhalten von Bakterien wird nach dem Beimpfen der Kulturplatten durch die Adaptation an die Umgebungsbedingungen durch eine Latenzphase („lag phase“) geprägt [25]. Anschließend erfolgt ein exponentielles Wachstum („log phase“), welches nach Übergang in eine stationäre Phase schließlich in eine regressive Phase übergeht. Die genaue Dauer der einzelnen Phasen ist v. a. von der Ausgangskeimzahl und den Wachstumseigenschaften der Bakterienart, aber auch von den Umgebungsbedingungen abhängig. Bei der Planung von Kulturversuchen mit Referenzbakterien müssen diese Faktoren Berücksichtigung finden, um relevante Ergebnisse ableiten zu können. Der Einsatz von Konservierungsmitteln ist in der Lag phase besonders relevant, da die Log phase verhindert und ein Übergang in die stationäre (mikrobistatisch) bzw. regressive (mikrobizid) Phase induziert wird [26]. Daraus lässt sich die Sinnhaftigkeit des Einsatzes von Konservierungsmitteln in Topika ableiten.

Konservierung von Topika

Konservierungsmittel werden als Hilfsstoffe in Topika eingesetzt, um die jeweilige Präparation mikrobiologisch haltbar zu machen und damit zu einer möglichst langen Lager- und „In-use“-Stabilität beizutragen, darüber hinaus aber auch, um den Anwender des Topikums vor unerwünschten Einflüssen pathogener und apathogener Mikroorganismen zu schützen [27, 28]. Der Einsatz von Konservierungsmitteln wird

bezüglich der Auswahl geeigneter chemischer Stoffe oder Stoffgemische mit mikrobistatischer oder mikrobizider Aktivität sowie deren Anwendungskonzentration regulatorisch definiert [29]. Sie besitzen vordergründig eine mikrobistatische Wirkung, die abhängig von der Konzentration und der spezifischen Reaktionsweise der zugehörigen Substanzgruppe ist [30]. Physikochemisch besitzen Konservierungsmittel typischerweise einen amphiphilen Charakter, sind gut wasserlöslich und können über den lipophilen Anteil an Membranen anhaften sowie diese passiv durchdringen. An der Zellmembran von Mikroorganismen kommt es zur konzentrationsabhängigen Permeationsstörung und im Falle einer mikrobiziden Konzentration zum Zelltod bzw. sogar zur Auflösung der kolloidphysikalischen Ordnung der Zelle und damit zu deren Autolyse. Die als Konservierungsmittel zugelassenen Substanzen unterliegen einem definierten Konzentrationsbereich und stammen aus den Substanzklassen der quartären Stickstoffverbindungen, Carbonsäuren, Alkohole, Phenole, Organoquecksilberverbindungen sowie sonstiger Stoffe [26, 31]. Konservierungsmittel wirken meistens im undissoziierten Zustand, sodass der pH-Wert der hydrophilen Phase, in Abhängigkeit von der pH-Toleranz relevanter Bakterienarten, direkten Einfluss auf die Wirkeffizienz nimmt. Die individuelle minimale Hemmkonzentration (MHK) entspricht weitestgehend der mikrobistatischen Konzentration [32]. Konservierungsmittel werden durch Kontamination verbraucht, sodass die MHK bei entsprechend hoher mikrobieller Last unterschritten werden kann und die mikrobistatische Wirkung ausbleibt. Die Abtötungsgeschwindigkeitskonstante bei mikrobizider Wirkung eines Konservierungsmittels ist stark von der Zahl und der Art der lebensfähigen Mikroorganismen und der Einwirkzeit des Konservierungsmittels abhängig. Aus regulatorischer Sicht wird die Einsatzkonzentration eines Konservierungsmittels nicht nur aus mikrobiologischer Perspektive bewertet [31]. So werden ebenso die toxikologische und allergologische Unbedenklichkeit und die chemische Inaktivität der zulässigen Substanzen innerhalb topischer Matrices beurteilt [33]. Der zugelassene Konzentrationsbereich wird dabei v. a. an der MHK innerhalb

der Formulierungen im Primärpackmittel ausgerichtet (mikrobiologische Stabilität; [26, 29]). Da Bakterien Wasser zum Wachstum benötigen, ist bei keimarm hergestellten galenischen Systemen v. a. dann eine Konservierung erforderlich, wenn sie eine äußere kontinuierliche hydrophile Phase aufweisen.

Von der Konservierung zur Antiseptik

Bisher wenig untersucht sind die antiseptischen Effekte von Konservierungsmitteln nach epikutaner Applikation auf die kutane Mikrobiota. Aus pharmakokinetischer Sicht ergeben sich aus den Kenntnissen der Konversion der Applikationsmatrix in die Segregationsmatrix des Vehikelsystems wesentliche Anhaltspunkte dafür, dass sich das Konzentrationsniveau der Konservierungsmittel auf der Haut nach der Applikation erheblich erhöhen kann. Während der strukturellen Umwandlung der Applikationsmatrix (Metamorphose) und der sich dabei vollziehenden Verdunstung volatiler Bestandteile der Formulierungs-

matrix, zu denen auch Wasser gerechnet werden muss, kommt es zum Entzug des Lösungsmittels der Konservierungsmittel und damit zu deren Konzentrierung auf der Hautoberfläche [34]. Daraus ergibt sich zwangsläufig, dass die Konservierungsmittel auch Einfluss auf die kutane Mikrobiota nehmen. Zudem sind bei der überwiegenden Zahl der Topika, insbesondere bei Arzneimitteln, weder der pH-Wert der Wasserphase noch die Pufferkapazität an den pH-Gradienten des Stratum corneum und damit an das physiologische Milieu der kutanen Mikrobiota angepasst [35]. Während der Einfluss des pH-Wertes und der Pufferkapazität in der Literatur durchaus als relevant für die Mikrobiota diskutiert wird, werden die Konzentrierung der Konservierungsmittel im Zuge der Matrixkonversion und deren Folgen für die Mikrobiota bisher selten adressiert [36]. Es finden sich lediglich Daten zu einzelnen kosmetischen Produkten (überwiegend „Wash-off“-Präparaten), die im Studiensetting die Remanenzeigenschaften der eingesetzten Konservierungsmittel vernachlässigen und ausschließlich 16S-

rRNA-Analysen betrachten [36]. Die bisher vorliegenden Daten lassen deshalb keine objektive Bewertung über die Einflussnahme von Konservierungsmitteln auf die kutane Mikrobiota zu, besonders bei „Leave-on“-Präparationen. Dies liegt auch an den sehr komplexen Zusammenhängen und Einflussfaktoren, die sich auf mikrobiologischer, pharmakokinetischer, pharmakodynamischer und galenischer Ebene darstellen. Deshalb bedarf es mehrerer methodischer Ansätze, die die verschiedenen Konservierungsstrategien untersuchen, um insbesondere die praktische Relevanz antiseptischer Effekte von Konservierungsmitteln besser bewerten zu können. Die vorliegenden Untersuchungen sollen deshalb anhand von Kulturversuchen an Referenzbakterien mit dermatologischer Relevanz zeigen, dass für Topika gängige Konservierungsmittel in ansonsten mikrobiologisch inerten Matrices grundsätzlich einen direkten Einfluss auf die Mikrobiota in Form antiseptischer Effekte ausüben können. Die daraus resultierenden Erkenntnisse sollen darüber hinaus der Erarbeitung klinischer Studien-

Hier steht eine Anzeige.



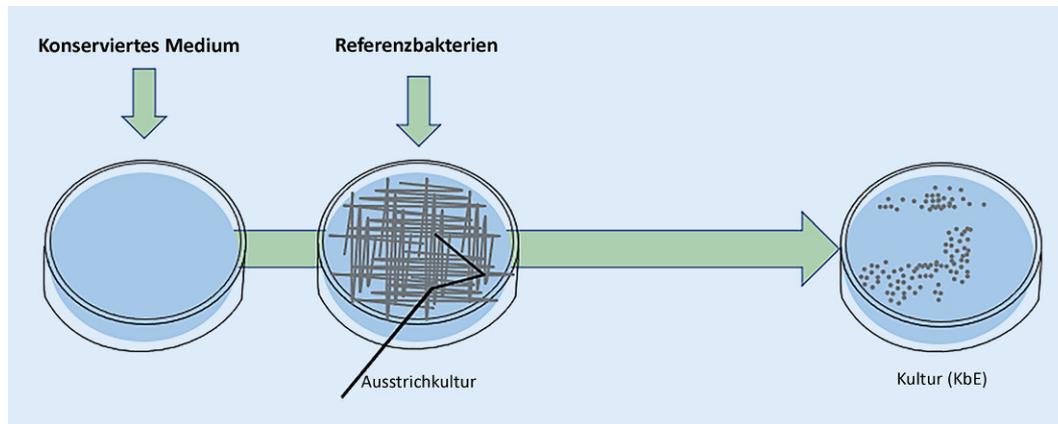


Abb. 1 ◀ Methodischer Ablauf des Mediumkonservierungstestes (MKT). *KbE* koloniebildende Einheiten

designs dienen, um eine weiterführende Untersuchung des Einflusses von Konservierungsmitteln auf die kutane Mikrobiota zu ermöglichen.

Material und Methoden

Auswahl von Referenzbakterien

Die 3 kutan bedeutsamen eu- oder dysbiotischen Bakterienarten: *Staphylococcus aureus* (DSM no. 6148, WS 1759; [37, 38]), *Pseudomonas aeruginosa* (DSM no. 1128, ATCC 9027; [39, 40]) und *Corynebacterium xerosis* (DSM no. 20743, ATCC 373; [41–46]) wurden aufgrund ihres Kulturverhaltens für die geplanten Untersuchungen ausgewählt. Die Kultur der Referenzbakterien erfolgte für *Staphylococcus aureus* auf Chapman-Agar (Oxoid® Tergitol-7-Agar; Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland), für *Pseudomonas aeruginosa* auf Cetrimid-CN-Agar (Pseudomonas CN Selectiv-Agar; Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) und für *Corynebacterium xerosis* in Casein-Soja-Pepton-Agar (Oxoid® TSA; Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland). Die Referenzbakterien wurden in Suspension auf den McFarland-Standard 0,5 (McFarland-Trübungsstandards und Wickerham-Karte; Fa. Bioanalytic GmbH, Umkirch, Deutschland) eingestellt und für die weitere Verwendung entsprechend verdünnt [47].

Auswahl von Konservierungsmitteln

Das *Europäische Arzneibuch* sieht definierte Substanzen zur Konservierung halb-

fester Zubereitungen vor. Dessen Einsatz richtet sich nach den Akzeptanzkriterien für die mikrobiologische Qualität nichtsteriler Darreichungsformen [29]. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Konservierungsmittel verwendet, die als gängige Konservierungsstrategien in Topika eingesetzt werden. Ausgewählt wurden ein Phenolgemisch aus Methyl-4-hydroxybenzoat (MHB; Fa. Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland) und Propyl-4-hydroxybenzoat (PHB; Fa. Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland; 0,05 %; 0,075 %; 0,1 % w/w), Sorbinsäure und Kaliumsorbat als Salz der Sorbinsäure (0,05 %; 0,1 %; 0,2 % w/w) sowie aus der Gruppe der Alkohole Propylenglykol (Fa. Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland; 10 %; 20 %; 30 % v/v). Die untersuchten Konzentrationen wurden nach dem für die Anwendung zugelassenen Konzentrationsbereichen festgelegt.

Auswahl eines Vehikelsystems

Als Vehikelsystem für die Konservierungsmittel wurde als einheitliche, mikrobiologisch inerte Matrix für die In-vitro-Untersuchungen ein 3%iges Hydroxyethylcellulose (HEC)-Gel (Fa. Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland) mit Phosphatpuffer (Kaliumdihydrogenphosphat; Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, und Dinatriumhydrogenphosphat; Fa. Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) verwendet, welches auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt wurde und damit dem pH-Optimum aller verwendeten Konservierungsmittel entspricht. Diese wurden in den entsprechenden Konzentrationen in das unkonservierte Vehikelsystem eingearbeitet und im Anschluss autoklaviert.

Experimentelles Design der In-vitro-Untersuchungen

Zur Untersuchung des Wachstums der ausgewählten Referenzbakterienarten unter Einfluss der Konservierungsmittel wurde eine experimentelle In-vitro-Strategie erarbeitet.

Entsprechend der gängigen Kultivierungsmethodik wurden 3 Interventions-schritte definiert: Medium, Bakterien und Kultur. Um den Einfluss der Konservierungsmittel auf den Kultivierungsvorgang zu untersuchen, wurde das jeweilige Konservierungsmittel in einer Konzentrationsreihe 1. dem Medium (Mediumkonservierungstest, MKT), 2. einer definierten Keimzahl von Bakterien (Vehikelkonservierungstest, VKT) und 3. der angewachsenen Kultur (Plattendiffusionstest, PDT) hinzugegeben und anschließend dessen antimikrobiellen Effekte quantifiziert. Als Negativkontrolle wurden das unkonservierte, inerte Vehikelsystem, physiologische Natriumchloridlösung (Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und Aqua bidestillata verwendet. Als Positivkontrollen diente eine wässrige 2%ige Chlorhexidinlösung (Fa. Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland).

Definition von Parametern

Im MKT und VKT wurden die koloniebildenden Einheiten (KbE) sowie der prozentuale Anteil der kolonisierten Fläche an der Gesamtfläche des Festmediums als Maß für das Bakterienwachstum bestimmt. Im PDT wurde hingegen der unbesiedelte Hof um die Testplättchen als Maß der antimikrobiellen Wirksamkeit ermittelt. Alle Parameter

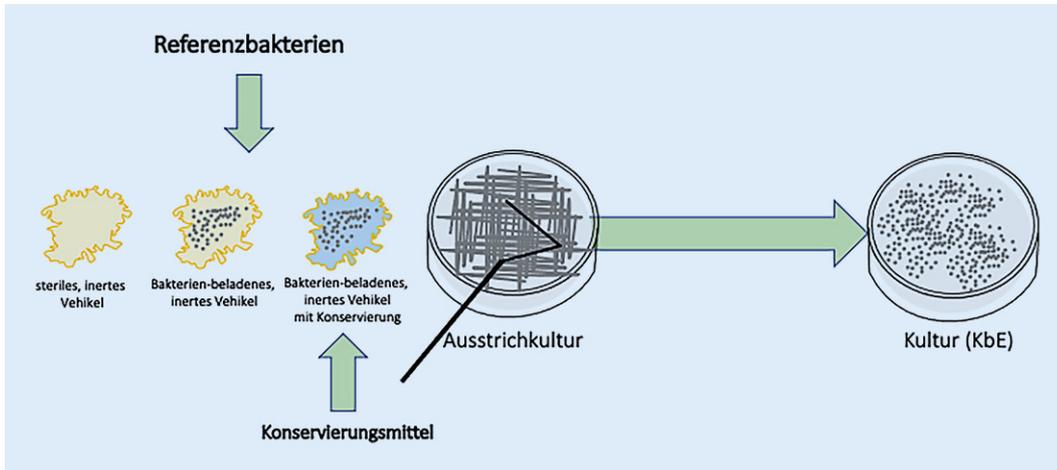


Abb. 2 ◀ Methodischer Ablauf des Vehikelkonservierungstest (VKT). KbE koloniebildende Einheiten

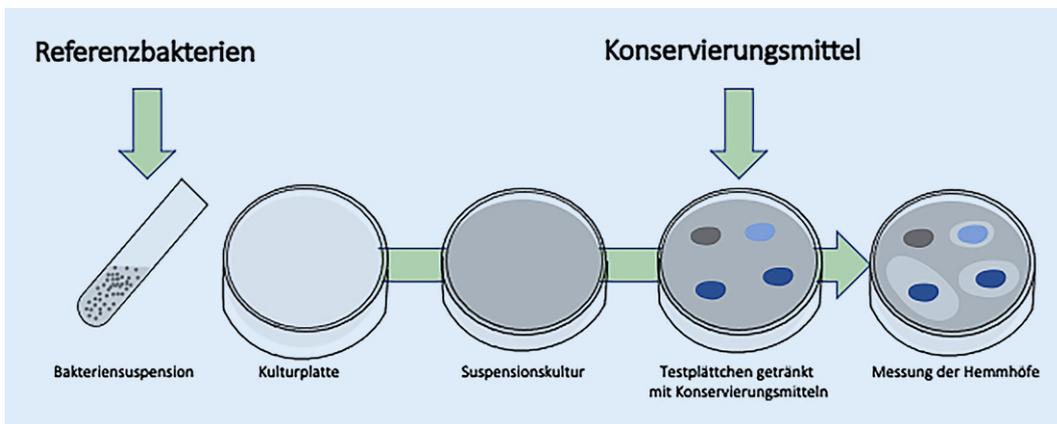


Abb. 3 ◀ Methodischer Ablauf des Plattendiffusionsonstest (PDT)

wurden jeweils nach 24 und 48 h erfasst und dokumentiert.

Mediumkonservierungstest

Im MKT wurde der Einfluss des Konservierungsmittels auf das Anwachsen der Kultur auf einem dafür geeigneten Medium untersucht. Dazu wurden die jeweiligen Konservierungsmittel in Luria-Bertani-Medium (LB-Agar, Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, Natriumchlorid 10 g/l, Agar-Agar 15 g/l; Fa. Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt und nach Autoklavierung als Plattenmedium ausgegossen. Die Referenzbakterienarten wurden in einer sterilen physiologischen Kochsalzlösung suspendiert (McFarland-Standard 0,5) und zu je 100 µl Bakteriensuspension auf die präparierte Agarplatte in einer Verdünnung von 1:100 (*Staphylococcus aureus*), von 1:1000 (*Pseudomonas aeruginosa*) und von 1:10 (*Corynebacterium xerosis*) aufgebracht und mit einem steri-

lisierten Drigalski-Spatel gleichmäßig verteilt (▣ Abb. 1).

Vehikelkonservierungstest

Der VKT diente der Bestimmung der bakteriellen Wachstumshemmung in einem konservierten Vehikelsystem. Dazu wurden 200 µl des konservierten Vehikels auf das jeweilige Kulturmedium aufgebracht und mit einem sterilen Drigalski-Spatel gleichmäßig verteilt. Anschließend wurde 100 µl Bakteriensuspension (McFarland-Standard 0,5) auf die mit dem konservierten Vehikel beschichtete Agarplatte in einer Verdünnung von 1:100 (*Staphylococcus aureus*), von 1:1000 (*Pseudomonas aeruginosa*) und von 1:10 (*Corynebacterium xerosis*) ausgegossen, durch Schwenken der Platte gleichmäßig verteilt und mittels Drigalski-Spatel mit diesem vermischt sowie anschließend kultiviert (▣ Abb. 2).

Plattendiffusionstest

Der PDT, der auch als Hemmhofstest bekannt ist, untersucht den Einfluss von Konservierungsmitteln auf eine floride Bakterienkultur. Dazu wurden die jeweiligen Bakterienarten in Casein-Soja-Pepton-Medium (Trypton-Soja-Bouillon; Fa. Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland) vorkultiviert. Anschließend wurde eine volle Impföse aus einer der Bakterienkulturen in 5 ml einer physiologischen Natriumchloridlösung eingebracht und die Bakteriensuspension auf Casein-Soja-Pepton-Agar (Oxoid® TSA; Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) ausgegossen, durch Schwenken der Platte gleichmäßig verteilt, der Überstand abgegossen und die Bakteriensuspension für ca. 3 min antrocknen lassen. Dann wurden wässrige Lösungen der Konservierungsmittel in Konzentrationsreihen sowie die Kontrollen mittels darin getränkter (5 µl) steriler Zellulosepapierplättchen (Cytiva Whatman® Filterpapier Gütegrad 1,

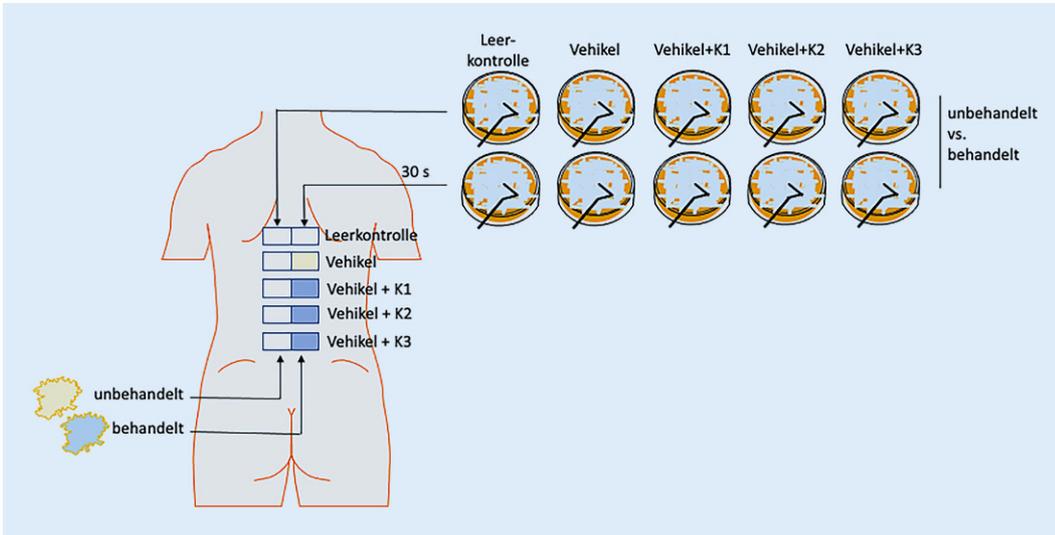


Abb. 4 Zusammenfassung der Methodik der Probenentnahme in der klinischen Studie; *Leerkontrolle* unbehandeltes Hautareal, *Vehikel* unkonserviertes Vehikel (Vehikelkontrolle), *K1* Methyl-4-hydroxybenzoat (0,075 %) und Propyl-4-hydroxybenzoat (0,025 %), *K2* Sorbinsäure/Kaliumsorbat (0,2 %), *K3* Propylenglykol (20 %)

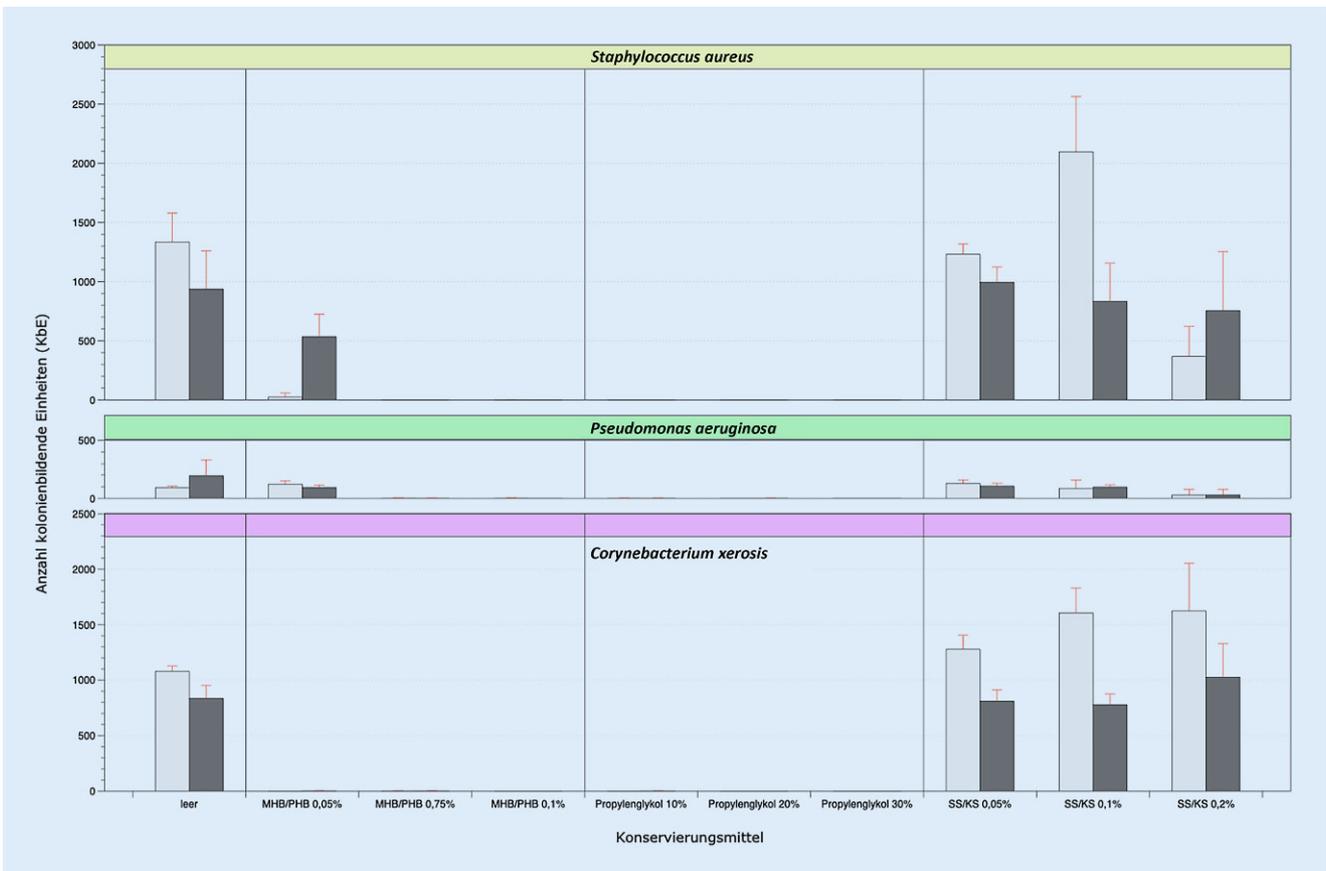


Abb. 5 Ergebnisse des Mediumkonservierungstestes (MKT); Inkubationszeit der Kulturplatten 24 h (*helle Balken*) und 48 h (*dunkle Balken*), $n = 3$, *MHB* Methyl-4-hydroxybenzoat, *PHB* Propyl-4-hydroxybenzoat, *SS* Sorbinsäure, *KS* Kaliumsorbat

Durchmesser 5 mm, Dicke 180 μm , Porengröße 11 μm , Grundgewicht 87 g/m^2 ; Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, USA) auf der Platte strukturiert platziert. Die dabei durch Diffusion der antimikrobiellen Testsubstanzen entstandenen Hemmhö-

fe wurden in ihrem Durchmesser, als Maß des antimikrobiellen Effektes, erfasst (**Abb. 3**).

Design der In-vivo-Untersuchung („Proof-of-concept“-Studie)

Mit positivem Votum (2020-063) der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wit-

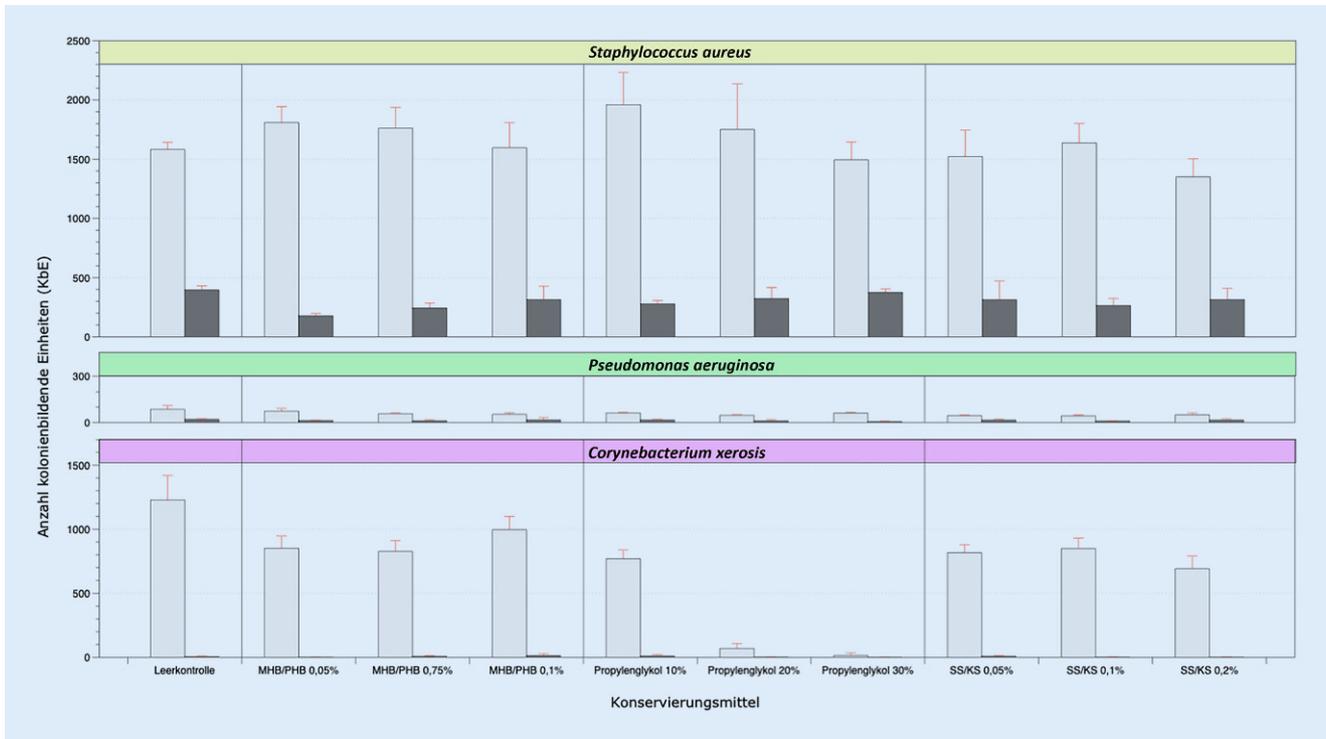


Abb. 6 ▲ Ergebnisse des Vehikelkonservierungstestes (VKT); Inkubationszeit der Kulturplatten 24 h (helle Balken) und 48 h (dunkle Balken), n = 3, MHB Methyl-4-hydroxybenzoat, PHB Propyl-4-hydroxybenzoat, SS Sorbinsäure, KS Kaliumsorbat

	<i>S. aureus</i>			<i>C. xerosis</i>			<i>P. aeruginosa</i>									
	24 h	48 h		24 h	48 h		24 h	48 h								
	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3	
Sorbinsäure	0,05 %	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
	0,10 %	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
	0,20 %	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
MHB/PHB	0,05 %	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
	0,08 %	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
	0,10 %	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Propylenglykol	10 %	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
	20 %	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
	30 %	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Chlorhexidin	2 %	23	25	24	23	25	24	21	21	20	21	21	20	8	7	7
NaCl		<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Aqua bidest.		<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5

Abb. 7 ◀ Plattendiffusionsstest (PDT) mit Hemmhofgrößen in Millimetern Durchmesser, V1–V3 Versuche 1–3, MHB Methyl-4-hydroxybenzoat, PHB Propyl-4-hydroxybenzoat

tenberg vom 30.07.2020 wurde die Proof-of-concept-Studie „K03/20-IIT – Prospektive, randomisierte, doppelt verblindete, monozentrische Studie zur Untersuchung des Einflusses von konservierten Topika auf das kutane Mikrobiom gesunder Probanden“ (Prüfplan fv03, 15.07.2020) durchgeführt. Das primäre Studienziel war es, Erkenntnisse zum Einfluss von Konservierungsmitteln in Topika auf die kutane Mikrobiota zu erlangen. Dazu wurden ohne Fallzahl-schätzung 24 gesunde

Proband:innen zwischen 18 und 40 Jahren eingeschlossen, die seit 4 Wochen keine systemische oder topische Medikation erhalten hatten, bei denen keine Unverträglichkeitsreaktionen gegenüber Inhaltsstoffen von Topika bekannt waren und die bereit waren, Lifestyle-Restriktionen im Vorfeld der Studie umzusetzen. Hierzu zählten ein mindestens einwöchige Karenz hinsichtlich Kosmetika oder Pflegeprodukten, eine mindestens 3-tägige Karenz hinsichtlich Seife und Shampoo

sowie eine mindestens 24-stündige Karenz hinsichtlich Körper-Wasser-Kontakt. In der Studie diente ein 3%iges Hydrogel auf Xanthanbasis als Vehikelsystem, welches unkonserviert (Vehikelkontrolle) oder mit MHB (0,075%) und PHB (0,025%) (Konservierung 1), Sorbinsäure/Kaliumsorbat (0,2%) (Konservierung 2) und Propylenglykol (20%) (Konservierung 3) konserviert untersucht wurde. Auf dem Rücken der Proband:innen wurden paravertebral auf gleicher Höhe jeweils

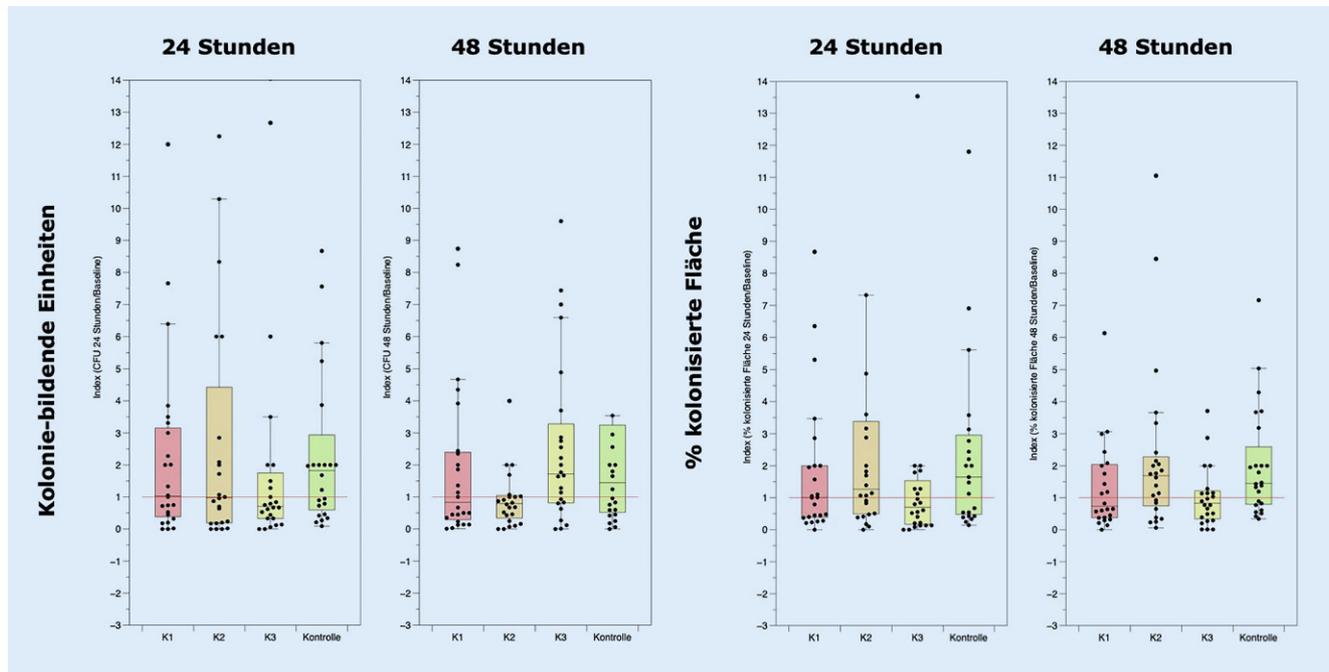


Abb. 8 ▲ Kulturergebnisse aus der klinischen Studie, $n=24$; K1 Methyl-4 Hydroxybenzoat (0,075 %) und Propyl-4-Hydroxybenzoat (0,025 %), K2 Sorbinsäure/Kaliumsorbitat (0,2%), K3 Propylenglykol (20 %), Kontrolle Vehikelkontrolle

links- und rechtsseitig 5 Felder (6×3 cm) markiert. Am Studientag wurden die 4 Testpräparationen und ein Leerkontrollfeld den Testfeldern entsprechend einem Randomisierungsplan (Research Randomizer V4.0; <http://www.randomizer.org/>) zugelost.

Eine Seite der Felder blieb als Leervergleich unbehandelt und abgestrichen. Auf der anderen Seite der Felder wurden 200 μ l der jeweiligen niedrigviskosen Testpräparation durch Pipettierung appliziert, mit einem sterilen Plastikspatel (Fa. Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gleichmäßig verteilt und nach einer Applikationszeit von 30 s ein Abstrich entnommen. Dazu wurde ein, in physiologischer Natriumchloridlösung befeuchteter, steriler Abstrichtupfer (Viskosetupfer auf Polyesterträger; Fa. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) verwendet, welcher 30 s lang fest und in Rollbewegungen über das markierte Areal gerieben wurde. Die Abstriche wurden anschließend zur Freisetzung der Mikroben aus dem Tupfer für 2 h bei 37 °C in einem Schüttelinkubator (200 rpm) in 500 μ l Casein-Soja-Pepton-Medium (Tryptone-Soja-Bouillon; Fa. Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland) vorinkubiert, auf eine vorgewärmte Casein-Soja-Pepton-Agarplatte

(Oxoid® TSA; Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) ausgestrichen und bei 37 °C für 48 h bebrütet. Nach 24 und 48 h wurden die Kulturplatten unter der Laminarbox standardisiert fotografiert und über digitale Bildanalyse (ImageJ Java 1.8.0_172 Mac OS X, National Institutes of Health, Washington D.C., USA) die koloniebildenden Einheiten (KbE) und prozentual die kultivierte Fläche der Kulturplatte bestimmt (▣ Abb. 4). Mittels Indexbildung wurden die jeweils intraindividuell korrespondierenden Werte ermittelt und interindividuell vergleichend dargestellt. Dabei wurde definiert, dass ein bakteriostatischer Effekt als wahrscheinlich gelten kann, wenn die Kultur nach Probenahme von behandelten Arealen eine mindestens 20 % geringere Kultureffizienz bot als das intraindividuelle unbehandelte, korrespondierende Areal.

Ergebnisse

Mediumkonservierungstest

Im Rahmen des MKT wurde der Einfluss des Konservierungsmittels auf die Kultivierungsfähigkeit der Referenzbakterien getestet, wobei je nach Konservierungsmittel und eingesetzter Konzentration

unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden. Die Konservierung mit Propylenglykol zeigte in allen getesteten Konzentrationen (10%, 20%, 30% v/v) ein inhibierendes Wachstum auf die Bakterienkultur (▣ Abb. 5). Ebenso ließ sich das Wachstum effektiv mittels der Parabenerbindung aus MHB/PHB in den eingesetzten Konzentrationen von 0,75 % und 0,1 % bei *S. aureus* und *P. aeruginosa* hemmen. Für das Referenzbakterium *C. xerosis* konnte bei dem Parabengemisch eine vollständige Hemmung bei allen Konzentrationsstufen (0,05 %, 0,75 %, 0,1 % w/w) ermittelt werden (▣ Abb. 5). Kein bakteriostatischer Effekt konnte für das Sorbinsäure/Kaliumsorbitat in allen Konzentrationen (0,05 %, 0,1 %, 0,2 % w/w) sowie getesteten Bakterienkulturen nachgewiesen werden (▣ Abb. 5).

Vehikelkonservierungstest

Im VKT konnte für alle 3 Konservierungsmittel konzentrationsunabhängig, bei allen Referenzbakterien übereinstimmend, kein bakteriostatischer Effekt dokumentiert werden (▣ Abb. 6).

Plattendiffusionstest

Die Durchführung des PDT zeigte unabhängig von den Einsatzkonzentrationen für alle Konservierungsmittel und Negativkontrollen keine Hinweise auf eine bakteristatische oder bakterizide Wirkung (▣ Abb. 7).

Proof-of-concept-Studie

In die Studie wurden insgesamt 24 Proband:innen ($m = 11$, $w = 13$) im mittleren Alter von 29 Jahren ($\text{min} = 21$, $\text{max} = 38$) eingeschlossen, die der Teilnahme schriftlich zugestimmt hatten und den Ein- und Ausschlusskriterien des Studienprotokolls vollständig entsprachen. Die in der Kultur erfassten Parameter der Anzahl koloniebildender Einheiten (KbE) und die prozentuale kolonisierte Fläche zeigen in Abhängigkeit vom Konservierungsmittel eine mindestens 20%ige Wachstumshemmung bei ca. 40–70% der Proband:innen. Dabei konnte beim Parameter KbE für MHB/PHB (24/48 h) eine Wachstumshemmung bei 41,7/50,0%, für Sorbinsäure/

Kaliumsorbat bei 45,8/70,8% und für Propylenglykol bei 58,3/37,5% der Proben nachgewiesen werden (▣ Abb. 8). Beim Parameter prozentual kolonisierte Fläche konnten vergleichbare Daten einer Wachstumshemmung für MHB/PHB (24/48 h) bei 58,3/54,2%, für das Sorbinsäure/Kaliumsorbat bei 41,7/37,5% sowie für Propylenglykol bei 54,2/54,2% beobachtet werden (▣ Abb. 8). Für die Indizes der Parameter nach 24 bzw. 48 h im Verhältnis zum Ausgangswert (Baseline) konnten keine statistischen Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden (Einwegvarianzanalyse, $p \leq 0,05$; ▣ Abb. 8). Die Daten zeigen eine sehr große Streuung, und die Effekte (Index $< 1 \hat{=}$ Wachstumshemmung) sind für die untersuchten Konservierungsmittel nicht einheitlich, konzentrationsabhängig und regelmäßig nachweisbar.

Diskussion

Zunächst bestätigen die vorliegenden Untersuchungsergebnisse die in der Einleitung dargestellten methodischen Schwierigkeiten

der qualitativen und quantitativen Charakterisierung von antimikrobiellen Effekten von topischen Interventionen auf die kutane Mikrobiota [48]. Im Rahmen dieser Studie wurde festgestellt, dass die getesteten Konservierungsmittel in unterschiedlichem Ausmaß antimikrobielle Effekte auf die eingesetzten Referenzbakterien ausüben können. Anders als im klassischen Konservierungsansatz, bei dem keimarme oder sterile, flüssige oder halb feste Zubereitungen mit den Konservierungsmitteln versetzt werden, um eine bakterielle Verunreinigung (sprich: das Anwachsen von Bakterien in der Zubereitung) zu verhindern, wurden in den vorliegenden Untersuchungen antiseptische Effekte bei einer vorgelegten bakteriellen Ausgangslast analysiert. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass in den In-vitro-Untersuchungen aufgrund der eliminationsabhängigen verminderten Bioverfügbarkeit der Konservierungsmittel und trotz der eingesetzten maximalen Konservierungsmittelkonzentration häufig kein oder nur ein geringer bakteristatischer Effekt nachgewiesen werden konnte. Dennoch

Hier steht eine Anzeige.

wird in der Zusammenschau deutlich, dass in Abhängigkeit vom Konservierungsmittel und dessen Einsatzkonzentration sowohl in vitro als auch in vivo antiseptische Effekte auftreten. So zeigt sich insbesondere für Propylenglykol, aber auch für das Parabengemisch, nicht nur in den In-vitro-Untersuchungen, sondern v. a. in der Proof-of-concept-Studie, eine Inhibition des Bakterienwachstums nach Konservierungsmittelapplikation. Auch wenn die vorliegenden Daten nicht durchgängig konstant sind, legen sie die Vermutung nahe, dass nicht nur bei einmaliger, sondern v. a. bei wiederholter Anwendung der Konservierungsmittel ein Einfluss auf die kutane Mikrobiota zu erwarten ist. Durch die begrenzte Fallzahl und die methodischen Schwierigkeiten ergeben sich zwar relevante Limitierungen der Aussagekraft, dennoch stützen die Proof-of-concept-Daten die Vermutung einer relevanten Interaktion zwischen Konservierungsmittel und kutaner Mikrobiota. Die wissenschaftliche Bedeutung dieser Assoziationsmuster ist bisher allerdings nur wenig beforscht. Deshalb bedarf es weiterer klinischer Studien, die sowohl größere Probanden- bzw. Patientenpopulationen als auch verschiedene Konservierungsmittel bzw. -gemische untersuchen und kulturelle, Sequenzierungs- und klinische Daten korrelieren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Proof-of-concept-Studie, dass von einer antiseptischen Wirkung von Konservierungsmitteln nach epikutaner Applikation auf der Hautoberfläche in Abhängigkeit vom verwendeten Substanzgemisch auszugehen ist. Sollte sich der Verdacht durch weiterführende Untersuchungen bestätigen, wäre es angebracht, den Einsatz von Konservierungsmitteln durch die gezielte Verwendung von galenischen Formulierungen mit kontinuierlicher lipophiler Außenphase zu beschränken, die Haltbarkeit von unkonserverten Topika zeitlich zu befristen bzw. den vermehrten Einsatz von rückschlagfreien Ventilen an Primärpackmitteln zu etablieren. Grundsätzlich ergeben sich aus dieser Thematik weitere Ansatzpunkte für eine neue Perspektive auf eine nachdrücklich zu fordernde, verbesserte Nachhaltigkeit topischer Formulierungen.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Johannes Wohlrab
Universitätsklinik und Poliklinik für
Dermatologie und Venerologie, Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg
Ernst-Grube-Straße 40, 06114 Halle (Saale),
Deutschland
johannes.wohlab@medizin.uni-halle.de

Danksagung. Die Autoren bedanken sich bei Fr. Antje Illner, Fr. Claudia Bruhne und Fr. Sylke Fasshauer für die hervorragende Unterstützung bei der technischen Umsetzung der Versuche sowie bei Fr. Dr. Linda Nemetschke, Fr. Dr. Julia Chuttke und Fr. Andrea Stennett für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der klinischen Studie sowie bei Frau Dr. Claudia Fritz, Frau Dr. Konstanze Bosse und Herrn Dr. Dennis Gerloff für die Beratung zu inhaltlichen Fragen.

Funding. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. K. Richter gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht. J. Wohlrab hat in den letzten 5 Jahren Zuwendungen für wissenschaftliche Projekte, klinische Studien, Vorträge oder Beratung von folgenden Unternehmen erhalten: Abbott, AbbVie, Actelion, Allergika, Almirall, Aristo, Astellas, Bay Pharma, Baxalta, Beiersdorf, Biogen, BMS, Boehringer Ingelheim, Celltrion, Dermapharm, Evolva, Evonik, Galderma, GSK, Helm, Hexal, Incyte, Infectopharm, Janssen-Cilag, Jentapharm, Johnson & Johnson, Klinge, Leo, Lilly, L'Oréal, Medac, Medice, Mibe, MSD, Mylan, Novartis, Novartis, Pierre Fabre, Pfizer, Regeneron, Sanofi, Skinomics, UCB, Wolff.

Alle beschriebenen Untersuchungen am Menschen oder an menschlichem Gewebe wurden mit Zustimmung der zuständigen Ethikkommission, im Einklang mit nationalem Recht sowie gemäß der Deklaration von Helsinki von 1975 (in der aktuellen, überarbeiteten Fassung) durchgeführt. Von allen Beteiligten liegt eine Einverständniserklärung vor.

Open Access. Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden.

Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen.

Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Literatur

- Grice EA (2014) The skin microbiome: potential for novel diagnostic and therapeutic approaches to cutaneous disease. *Semin Cutan Med Surg* 33:98–103
- Sander MA, Sander MS, Isaac-Renton JL et al (2019) The cutaneous microbiome: implications for dermatology practice. *J Cutan Med Surg* 23:436–441
- Rodrigues Hoffmann A (2017) The cutaneous ecosystem: the roles of the skin microbiome in health and its association with inflammatory skin conditions in humans and animals. *Vet Dermatol* 28:e06–e15
- Chehoud C, Raifall S, Tyldsley AS et al (2013) Complement modulates the cutaneous microbiome and inflammatory milieu. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:15061–15066
- Loomis KH, Wu SK, Ernlund A et al (2021) A mixed community of skin microbiome representatives influences cutaneous processes more than individual members. *Microbiome* 9:22
- Schoch JJ, Monir RL, Satcher KG et al (2019) The infantile cutaneous microbiome: a review. *Pediatr Dermatol* 36:574–580
- Pammi M, O'Brien JL, Ajami NJ et al (2017) Development of the cutaneous microbiome in the preterm infant: a prospective longitudinal study. *PLoS ONE* 12:e176669
- Yu Y, Champer J, Beynet D et al (2015) The role of the cutaneous microbiome in skin cancer: lessons learned from the gut. *J Drugs Dermatol* 14:461–465
- Mikolajczyk R, Roesner LM (2019) Grundlegende Aspekte zum Hautmikrobiom. *Hautarzt* 70:400–406
- Tomic-Canic M, Perez-Perez GI, Blumenberg M (2014) Cutaneous microbiome studies in the times of affordable sequencing. *J Dermatol Sci* 75:82–87
- Kong HH, Segre JA (2017) The molecular revolution in cutaneous biology: investigating the skin microbiome. *J Invest Dermatol* 137:e119–e122
- Beule AG (2018) Das Mikrobiom – die unplanbare Grosse zukünftiger Therapien. *Laryngorhinootologie* 97:S279–S311
- Goodrich JK, Di Rienzi SC, Poole AC et al (2014) Conducting a microbiome study. *Cell* 158:250–262
- Kumar R, Eipers P, Little RB et al (2014) Getting started with microbiome analysis: sample acquisition to bioinformatics. *Curr Protoc Hum Genet* 82(1):18.8.1–18.8.29
- Barberis C, Almuzara M, Join-Lambert O et al (2014) Comparison of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry system and conventional phenotypic methods for identification of Gram-positive rods. *Plos One* 9:e106303
- Samb-Ba B, Mazenot C, Gassama-Sow A et al (2014) MALDI-TOF identification of the human Gut microbiome in people with and without diarrhea in Senegal. *Plos One* 9:e87419
- Yu Z, Peruziy MF, Dumolin C et al (2019) Assessment of food microbiological indicators applied on poultry carcasses by culture combined MALDI-TOF MS identification and 16S rRNA amplicon sequencing. *Food Microbiol* 82:53–61
- Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE 3rd et al (1997) Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev* 10:125–159

19. Stulberg E, Fravel D, Proctor LM et al (2016) An assessment of US microbiome research. *Nat Microbiol* 1:15015
20. Estrada-Pena A, Cabezas-Cruz A, Obregon D (2020) Behind taxonomic variability: the functional redundancy in the tick microbiome. *Microorganisms* 8:1829
21. Riverain-Gillet E, Guet-Revillet H, Jais JP et al (2020) The surface microbiome of clinically unaffected skinfolds in hidradenitis suppurativa: a cross-sectional culture-based and 16S rRNA gene amplicon sequencing study in 60 patients. *J Invest Dermatol* 140:1847–1855e6
22. Johannesen KM, Kolekar SB, Greve N et al (2019) Differences in mortality in *Fusobacterium necrophorum* and *Fusobacterium nucleatum* infections detected by culture and 16S rRNA gene sequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 38:75–80
23. Meyer TE, Bansal AK (2005) Stabilization against hyperthermal denaturation through increased CG content can explain the discrepancy between whole genome and 16S rRNA analyses. *Biochemistry* 44:11458–11465
24. Berry H, Michaels I (1947) The evaluation of the bactericidal activity of ethylene glycol and some of its monoalkyl ethers against *Bacterium coli*; conversion of the sigmoid survivor-time disinfection curve to a linear relationship. *Q J Pharm Pharmacol* 20:527–537
25. Jeanson S, Floury J, Gagnaire V et al (2015) Bacterial colonies in solid media and foods: a review on their growth and interactions with the micro-environment. *Front Microbiol* 6:1284
26. Pastor-Nieto MA, Alcantara-Nicolas F, Melgar-Molero V et al (2017) Preservatives in personal hygiene and cosmetic products, topical medications, and household cleaners in Spain. *Actas Dermosifiliogr* 108:758–770
27. Na'was T, Alkofahi A (1994) Microbial contamination and preservative efficacy of topical creams. *J Clin Pharm Ther* 19:41–46
28. Perry HD, Donnenfeld ED (2003) Issues in the use of preservative-free topicals. *Manag Care* 12:39–41
29. Europäisches Arzneibuch Ph. Eur. 8.0 Monographie 5.1.4. Mikrobiologische Qualität von nicht-sterilen pharmazeutischen Zubereitungen und von Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung.
30. Rastogi SC (2000) Analytical control of preservative labelling on skin creams. *Contact Dermatitis* 43:339–343
31. Ravita TD, Tanner RS, Ahearn DG et al (2009) Post-consumer use efficacies of preservatives in personal care and topical drug products: relationship to preservative category. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:35–38
32. Rahali Y, Pense-Lheritier AM, Mielcarek C et al (2009) Optimization of preservatives in a topical formulation using experimental design. *Int J Cosmet Sci* 31:451–460
33. Skinner SL, Marks JG (1998) Allergic contact dermatitis to preservatives in topical medicaments. *Am J Contact Dermat* 9:199–201
34. Surber C, Knie U (2018) Metamorphosis of vehicles: mechanisms and opportunities. *Curr Probl Dermatol* 54:152–165
35. Wohlrab J, Gebert A (2018) pH and buffer capacity of topical formulations. *Curr Probl Dermatol* 54:123–131
36. Murphy B, Hoptroff M, Arnold D et al (2021) In-vivo impact of common cosmetic preservative systems in full formulation on the skin microbiome. *PLoS ONE* 16:e254172
37. Francuzik W, Franke K, Schumann RR et al (2018) *Propionibacterium acnes* abundance correlates

Impact of preservatives in topicals on the cutaneous microbiota

Preservatives are used to stabilize topical preparations and protect the user from the influence of pathogenic microbes. After the application of a topical preparation, the matrix undergoes a metamorphosis, and by proportional evaporation of the hydrophilic phase the preservative may accumulate on the skin surface. This is believed to lead to antiseptic effects and may influence the diversity of the cutaneous microbiota. The regulation of the cutaneous microbiome and the associated influencing factors is a complex system that results in highly individualized conditions. Therefore, investigations on the influence of defined interventions are methodologically difficult. In the present proof-of-concept study, potential antiseptic effects of preservatives were investigated in a combination of in vitro and in vivo methods using microbiological culture tests. In addition, the investigations served to develop a clinical study design to answer further questions and use of an extended range of methods. The results support the hypothesis of an antiseptic effect of the tested preservatives (methyl-4-hydroxybenzoate and propyl-4-hydroxybenzoate, potassium sorbate and propylene glycol) on prominent reference bacteria, which could also be observed in clinical settings.

Keywords

Cutaneous microbiome · Microbiota · Preservatives, pharmaceutical · Vehicle system · Metamorphosis of vehicle

- inversely with *staphylococcus aureus*: data from atopic dermatitis skin microbiome. *Acta Derm Venereol* 98:490–495
38. Laborel-Preneron E, Bianchi P, Boralevi F et al (2015) Effects of the *staphylococcus aureus* and *staphylococcus epidermidis* secretomes isolated from the skin microbiota of atopic children on CD4+ T cell activation. *PLoS ONE* 10:e141067
39. Roy PH, Tetu SG, Larouche A et al (2010) Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *Plos One* 5:e8842
40. D'Arpa P, Karna SLR, Chen T et al (2021) *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome adaptations from colonization to biofilm infection of skin wounds. *Sci Rep* 11:20632
41. Komura I, Yamada K, Otsuka S et al (1975) Taxonomic significance of phospholipids in *Coryneform* and *Nocardioform* bacteria. *J Gen Appl Microbiol* 21:251–261
42. Yamada K, Komagata K (1970) Taxonomic studies on *Coryneform* bacteria. 2. principal amino acids in cell wall and their taxonomic significance. *J Gen Appl Microbiol* 16:103–113
43. Yamada K, Komagata K (1970) Taxonomic studies on *Coryneform* bacteria. 3. DNA base composition of *coryneform* bacteria. *J Gen Appl Microbiol* 16:215–224
44. Yamada K, Komagata K (1972) Taxonomic studies on *Coryneform* bacteria. 4. morphological, cultural, biochemical, and physiological characteristics. *J Gen Appl Microbiol* 18:399–416
45. Yamada K, Komagata K (1972) Taxonomic studies on *Coryneform* bacteria. 5. classification of *Coryneform* bacteria. *J Gen Appl Microbiol* 18:417–431
46. Komagata K, Yamada K, Ogawa H (1969) Taxonomic studies on *Coryneform* bacteria. I. division of bacterial cells. *J Gen Appl Microbiol* 15:243
47. Zapata A, Ramirez-Arcos S (2015) A comparative study of McFarland turbidity standards and the Densimat photometer to determine bacterial cell density. *Curr Microbiol* 70:907–909
48. Gopinath D, Menon RK, Banerjee M et al (2019) Culture-independent studies on bacterial dysbiosis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol* 139:31–40